



**FACULTAD DE FARMACIA**  
**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

**TRABAJO DE FIN DE GRADO**

***PAPEL DE LA TOXINA PERTUSSIS Y ADENILATO CICLASA  
EN LA PREVALENCIA INTRACELULAR DE BORDETELLA  
PERTUSSIS Y DESARROLLO DE NUEVAS VACUNAS***

Autor: Agustín Clemente Moragón

Tutor: Dra. Gloria Molero Martín-Portugués

Convocatoria: Junio 2017

# ÍNDICE

<b>1. Introducción y antecedentes</b>	<b>Págs.</b>
1.1. Características microbiológicas de <i>B. pertussis</i>	3
1.2. Epidemiología de la tos ferina	4
1.3. Aspectos clínicos de la tos ferina: generalidades	5-7
1.4. Regulación de genes de virulência: sistema BvgAS	7-9
1.5. Toxina pertussis (PT) y adenilato ciclasa (TAC)	9-11
1.6. Calendario de vacunación para la tos ferina	11-12
<b>2. Objetivos</b>	<b>13</b>
<b>3. Materiales y métodos</b>	<b>13</b>
<b>4. Resultados y discusión</b>	
4.1. Papel de la PT y TAC en el desarrollo intracelular de <i>Bordetella pertussis</i>	13-16
4.2. Respuesta inmune y desarrollo de nuevas vacunas	16-19
<b>5. Conclusiones</b>	<b>19</b>
<b>6. Bibliografía</b>	<b>20</b>

## RESUMEN

La tos ferina es una enfermedad infecciosa originada por *Bordetella pertussis*, que constituye uno de los principales problemas de salud pública mundial en la actualidad. En países desarrollados, a pesar de la alta cobertura de vacunación en la infancia, se ha reportado un aumento de casos en ciertos grupos de edad, como adolescentes y adultos jóvenes, así como lactantes pequeños, presentando éstos las mayores tasas de hospitalización, complicaciones graves y mortalidad. Sin embargo, poco se conoce acerca de las formas y mecanismos de persistencia de este patógeno. En los últimos años, sucesivos estudios han postulado la existencia de una fase intracelular en la que dos de las principales toxinas de *Bordetella pertussis*, como la toxina pertussis (PT) y adenilato ciclasa (TAC), parecen desempeñar un papel fundamental, contribuyendo así a la prevalencia bacteriana. Todo ello, junto a las limitaciones de las actuales estrategias de vacunación basadas en vacunas de carácter acelular, supone la necesidad de proseguir la investigación en búsqueda de vacunas más apropiadas para neonatos y con mejor inmunogenicidad.

## 1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

### 1.1. Características microbiológicas de *Bordetella pertussis*

*Bordetella pertussis*, agente etiológico de la tos ferina o tos convulsiva, es una  $\beta$ -proteobacteria de la familia *Alcaligenaceae*, género *Bordetella*. Se trata de un cocobacilo gramnegativo pequeño y pleomórfico, de 0,2 a 0,5  $\mu\text{m}$  de diámetro y 0,5 a 2  $\mu\text{m}$  de largo. Es una bacteria aerobia estricta, de metabolismo oxidativo, inmóvil, encapsulada, sin flagelos, no formadora de esporas y de crecimiento lento en medio de cultivo <sup>(1,2)</sup>. Generalmente se disponen como células aisladas o en parejas, y su temperatura óptima de crecimiento es de 35-36°C en atmósfera húmeda. Las colonias aparecen normalmente a las 72h y son pequeñas, brillantes, lisas, de bordes regulares, convexas y de color perlado <sup>(2)</sup>.

El género *Bordetella* incluye otras especies de las que, al menos, *B. parapertussis* es reconocida como patógeno respiratorio en humanos y responsable de un cuadro clínico similar al de la tos ferina clásica por *B. pertussis*, pero de menor intensidad y poco frecuente. Por otro lado, *B. bronchiseptica* es un agente comúnmente aislado en animales, como perros, gatos y conejos, y es raro encontrarlo en humanos <sup>(3)</sup>.

## 1.2. Epidemiología de la tos ferina

En España, como en otros países con políticas de vacunación similares (UE, EEUU, Canadá o Australia), la tos ferina ha resurgido en los últimos años con un aumento progresivo de la incidencia, hospitalización y mortalidad. Entre las posibles causas que se señalan, destacan: la mejora en el acceso a las técnicas de diagnóstico rápido que permiten una mejor notificación de la enfermedad, la evanescencia del efecto protector de la vacuna y la menor efectividad de las vacunas acelulares (Pa) con respecto a las de células enteras (Pw) <sup>(4)</sup>.

La tos ferina ha aumentado en todos los grupos de edad; sin embargo, preocupa especialmente por su gravedad en lactantes. Se trata de una enfermedad prevenible por vacunación que mantiene un patrón epidémico cíclico, con ondas que se presentan cada 3-5 años (entre 1998 y 2016 se han descrito hasta cinco periodos epidémicos). Hasta el año 2009, la incidencia de tos ferina fue inferior a 2 por 100.000 habitantes. Desde el año 2010, la enfermedad se encuentra en una situación de epidemia sostenida, manteniendo el patrón cíclico pero siempre en un rango superior al de los años previos. En 2014 se inició una quinta onda que alcanzó su máximo valor en 2015 con 17,99 casos por 100.000 habitantes, evidenciando un marcado aumento de tos ferina. Los datos provisionales de 2016 indican que la onda se encuentra en la fase descendente <sup>(4)</sup>.

Así pues, representa un problema de salud pública mundial en países desarrollados ya que, a pesar de la amplia cobertura de vacunación, se ha observado un aumento de casos principalmente en adolescentes, adultos jóvenes y lactantes pequeños, presentando éstos últimos las mayores tasas de hospitalización, complicaciones graves y mortalidad <sup>(5)</sup>.

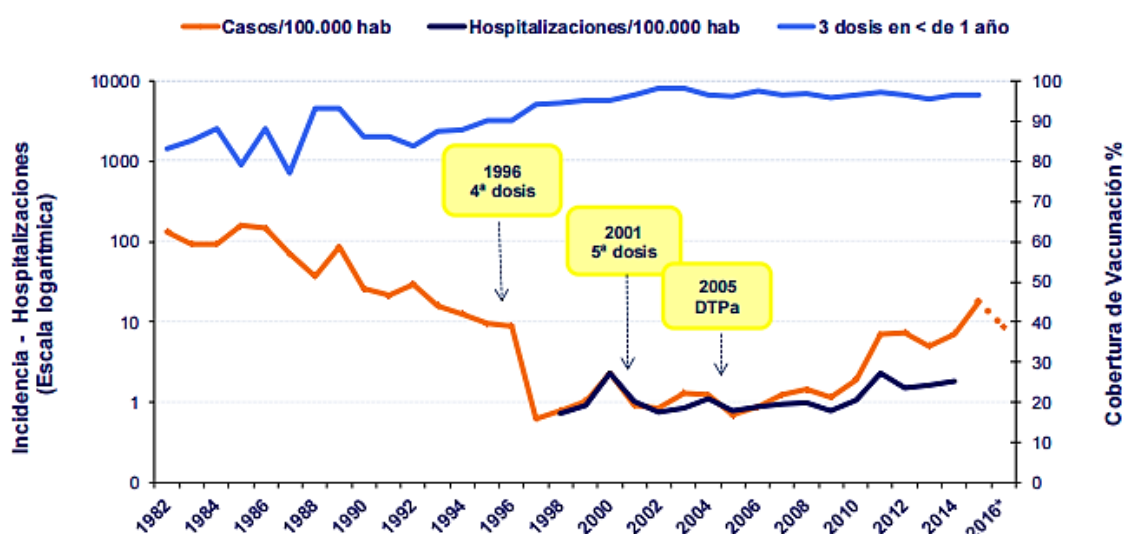


Figura 1. Tos ferina. Incidencia y hospitalizaciones por 100.000 habitantes y coberturas de vacunación con tres dosis (España 1982-2016) <sup>5</sup>

### 1.3. Aspectos clínicos de la tos ferina: generalidades

La tos ferina es una infección causada por *B. pertussis*, que inicia con la adherencia de la bacteria a las células epiteliales ciliadas del tracto respiratorio, produciendo un daño tisular localizado. El patógeno se adhiere a las células ciliadas del epitelio nasofaríngeo y del árbol traqueo-bronquial mediante moléculas de adhesión, como la hemaglutinina filamentosa (HFA), fimbrias (FIM), pertactina (PRN), y otras proteínas de superficie, que junto con la citotoxina traqueal (CTT), la toxina pertussis (TP), dermonecrótica (TDN) y adenilato ciclasa (TAC), constituyen parte de los determinantes de patogenicidad de la bacteria. La tos ferina se trata de una enfermedad altamente contagiosa, cuya transmisión se produce a partir del contacto con secreciones respiratorias aerosolizadas de una persona infectada. La mayor contagiosidad se produce al inicio de la fase catarral y durante los primeros 21 días del cuadro de tos. La tos es el síntoma guía que permite el diagnóstico y, en ausencia de la tos típica, el diagnóstico es difícil y se realiza generalmente de forma tardía, a menos que se sospeche la enfermedad por contagio a partir de un caso conocido <sup>(6)</sup>.

Tras un periodo de incubación de alrededor de 7-10 días, aparecen los síntomas correspondientes a la fase catarral de la enfermedad. En la fase catarral, se presentan síntomas leves de rinorrea, tos, febrícula y congestión nasal, siendo el cuadro difícilmente distinguible de un resfriado común. Dicha fase suele durar dos semanas y en ella rara vez se sospecha la presencia de la enfermedad. La fase paroxística oscila entre 4-8 semanas y en ella la tos se presenta en forma de accesos de predominio nocturno acompañados en ocasiones de congestión o cianosis facial, vómitos, sensación de ahogo y *gallo* inspiratorio tras los golpes de tos. Los recién nacidos y lactantes más pequeños pueden presentar episodios de apnea como síntoma más relevante. La fase de convalecencia suele durar otras 2-4 semanas y en ella la tos desaparece gradualmente. No obstante, en muchos casos no se observa este patrón *clásico* y únicamente se manifiestan síntomas catarrales leves sin tos característica. La mejora en el diagnóstico ha puesto de manifiesto cómo los casos *atípicos* con escasos síntomas son más frecuentes de lo que previamente se sospechaba. Entre las complicaciones más frecuentes se incluyen hemorragia subconjuntival, sobreinfecciones bacterianas (neumonía y otitis media), convulsiones, encefalopatía y, en recién nacidos o lactantes pequeños, apnea y muerte súbita. Las complicaciones se relacionan con la edad y la inmunización previa, y son más frecuentes y graves en recién nacidos y lactantes susceptibles menores de 4-6 meses <sup>(6)</sup>.

El diagnóstico clínico es relativamente sencillo en lactantes y niños no vacunados que presentan un cuadro de tos típica, pero no lo es en niños vacunados, adolescentes y adultos en los que el cuadro de tos no es característico. Muchos pacientes, especialmente adolescentes y adultos diagnosticados de tos ferina, habían sido previamente catalogados erróneamente de cuadros alérgicos o simplemente de tos prolongada inespecífica <sup>(6)</sup>. El diagnóstico de laboratorio se realiza a partir de un cultivo de secreción nasofaríngea, aspirado bronquial o lavado broncoalveolar en un medio selectivo específico, como el Regan-Lowe o Bordet Gengou <sup>(7)</sup>. En los últimos años, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se ha convertido en la técnica diagnóstica de elección por su sensibilidad y rapidez, pudiendo ser útil incluso en los primeros cuatro días del inicio del tratamiento antibiótico. Así pues, el cultivo y la PCR son útiles las primeras 3-4 semanas, mientras que en cuadros de evolución más prolongada el diagnóstico debe hacerse por serología, dada la baja rentabilidad de las muestras nasofaríngeas cuando la evolución de la enfermedad supera las 3-4 semanas <sup>(6)</sup>. La inmunofluorescencia directa es un examen de sensibilidad intermedia y alta especificidad, que disminuye con la edad del paciente y duración del cuadro clínico <sup>(7)</sup>. Su principal limitante es la alta cantidad de falsos positivos <sup>(8)</sup>. En lactantes y niños pequeños, puede observarse leucocitosis en el hemograma, a expensas de un aumento significativo de los linfocitos <sup>(6)</sup>.

El tratamiento sintomático tiene la finalidad de disminuir la intensidad y frecuencia de la tos, así como proporcionar una oxigenación, hidratación y alimentación adecuadas, especialmente en recién nacidos y lactantes pequeños con cuadros severos que pueden requerir incluso ventilación asistida. Los fármacos antitusígenos han demostrado una eficacia limitada y se han empleado diversos tratamientos como el salbutamol, o corticoides inhalados u orales sin evidencias claras de su efectividad. El tratamiento etiológico tiene la finalidad de erradicar la infección y así interrumpir la transmisión. El impacto del tratamiento sobre los síntomas es escaso y depende de la duración previa de la enfermedad <sup>(6)</sup>. Los macrólidos son los antibióticos de primera elección, ya que tanto la eritromicina como la claritromicina y azitromicina han demostrado su eficacia. Recientes estudios han puesto de manifiesto que pautas cortas de siete días (claritromicina) y cinco días (azitromicina) son adecuadas para conseguir una buena tasa de erradicación. La alternativa en pacientes que no toleran los macrólidos es el cotrimoxazol <sup>(6,8)</sup>.

A pesar de que la quimioprofilaxis es controversial, se recomienda su empleo con la finalidad de evitar las formas severas de la enfermedad en individuos con riesgo elevado

grave, es decir, lactantes menores de un año, embarazadas, ancianos y portadores de enfermedades crónicas <sup>(7)</sup>. Los antibióticos utilizados y las dosis son las mismas que para el tratamiento y, en caso de iniciarse precozmente tras el contacto, preferentemente antes de los 21 días, su efectividad está contrastada. En el caso de individuos no vacunados o incompletamente vacunados, además de la profilaxis antibiótica, debe iniciarse o completarse la vacunación con la vacuna apropiada <sup>(6,8)</sup>.

#### 1.4. Regulación de genes de virulencia: sistema BvgAS

La persistencia de *B. pertussis* es inesperada puesto que se trata de una bacteria altamente clonal y carece de la diversidad genética característica de otros patógenos. Entre las diferencias observadas en los distintos aislamientos clínicos, destacan principalmente la expresión diferencial de genes que codifican proteínas de superficie o mutaciones en genes de proteínas de secreción. A su vez, no se han identificado en ninguna especie del género *Bordetella* diferencias fenotípicas atribuidas a islas de patogenicidad, plásmidos, elementos transponibles o inserciones procedentes del genoma de fagos. En *B. pertussis*, dicha regulación constituye un sofisticado repertorio que proporciona diversidad fenotípica a poblaciones de carácter altamente clonal y genéticamente homogéneas <sup>(9)</sup>.

Para detectar y transducir las señales procedentes del medio externo en distintas respuestas de carácter intracelular, *B. pertussis* emplea sistemas de regulación de dos componentes. Estos sistemas consisten en un sensor quinasa (SK) y un regulador de respuesta (RR), que actúa como activador transcripcional. El principal sistema implicado en la regulación de más de cien genes de virulencia consiste en el sensor quinasa BvgS y el regulador de respuesta BvgA <sup>(9)</sup>. El locus implicado es el *bvgAS* que consiste en al menos dos genes íntimamente ligados, *bvgS* y *bvgA* respectivamente. No todos los factores de virulencia se encuentran regulados por este locus, sino que existen factores regulados independientemente del sistema BvgAS y otros de expresión constitutiva. Entre los factores de virulencia regulados por este sistema se encuentran la HFA, FIM, PRN y otros autotransportadores, así como la TAC, TP y TDN. En el sistema BvgAS, la transducción de la señal ocurre mediante un mecanismo de fosfotransferencia de cuatro pasos, el cual finaliza con la fosforilación de BvgA, que incrementa su afinidad por los promotores transcripcionales y cuya unión determina la expresión de una gran variedad de factores de virulencia. Como en otros sistemas de dos componentes, la amplificación de la señal ocurre

mediante la auto-activación transcripcional de los genes *bvgAS* a través del intermedio fosforilado de BvgA (BvgA~P) <sup>(10,11)</sup>.

En la actualidad, se describen tres fases de *B. pertussis* (Bvg<sup>+</sup>, Bvg<sup>-</sup> y Bvg<sup>i</sup>) en función de sus diferentes propiedades antigénicas y se emplea el término modulación fenotípica para describir la transición entre ellas. La fase Bvg<sup>+</sup>, caracterizada por la expresión de todas aquellas adhesinas y toxinas activadas por el sistema BvgAS, es requerida para que la bacteria sea virulenta. Esta fase se manifiesta bajo condiciones ambientales *no moduladoras* que contribuyen a la fosforilación de BvgS, como una temperatura cercana a 37°C. La fase Bvg<sup>i</sup>, en la cual el sistema BvgAS no se encuentra inducido completamente, podría jugar un papel importante en la transmisión por aerosoles respiratorios o en las fases iniciales de la infección. Las condiciones *moduladoras*, como el crecimiento a una temperatura de 25°C, o la presencia de ácido nicotínico o sulfato magnésico, resultan en la reducción de la actividad de BvgS, conduciendo así a la fase Bvg<sup>-</sup>. Se ha demostrado cómo la expresión inapropiada de la fase Bvg<sup>-</sup> *in vivo* es perjudicial para que se lleve a cabo con éxito la infección. Distintas hipótesis sugieren que podría jugar un papel importante en la penetración intracelular o la transmisión entre huéspedes. La unión diferencial a las regiones reguladoras de los distintos genes de virulencia constituye un simple pero efectivo sistema por el cual la regulación a través de BvgA~P resulta en diferentes cinéticas de expresión. Aquellos genes involucrados en las fases tempranas de la infección, como los de las adhesinas o el propio *bvgA*, se activan de forma inmediata en presencia de condiciones ambientales óptimas, debido a la alta afinidad de BvgA~P por las regiones reguladoras de dichos genes. Sin embargo, los genes cuyos productos presentan un papel posterior en el proceso infectivo, como las toxinas y los sistemas de secreción, permanecen inactivos hasta que la concentración intracelular de BvgA~P incrementa lo suficiente como para interactuar con los respectivos sitios de unión de baja afinidad. Además, existe un gen intermedio (*bipA*) que es activado a niveles moderados de BvgA~P, mientras que a niveles elevados su expresión se ve reprimida <sup>(9)</sup>. A su vez, el sistema BvgAS no solo activa una serie de genes de virulencia (*vags*), sino que también bloquea la expresión de otro conjunto de genes (*vrgs*). La represión de alguno de estos genes requiere la expresión de un gen regulador intermedio (*bvgR*) <sup>(10)</sup>.

Además del sistema BvgAS, *B. pertussis* presenta un segundo sistema regulador de la respuesta intracelular, denominado RisAS. Ese sistema se encuentra codificado en el locus *risAS*, que codifica el regulador de respuesta RisA y el sensor con actividad quinasa RisS. En *B. pertussis*, el gen *risS* contiene un desplazamiento en el marco de lectura, lo que conduce a



una proteína RisS truncada no funcional. Sin embargo, este patógeno expresa una proteína RisA funcionalmente activa. La delección de *risA* conlleva una fuerte disminución de la transcripción de los *vrgs*, lo que sugiere que RisA juega un papel antagónico al de BvgR<sup>(10)</sup>.

### 1.5. Toxina pertussis (TP) y adenilato ciclasa (TAC)

La toxina pertussis (TP) es sintetizada y secretada exclusivamente por *B. pertussis* y posee la estructura clásica tipo A-B de las exotoxinas bacterianas. Es una proteína de expresión tardía, por lo que se encuentra presente en la fase virulenta (Bvg<sup>+</sup>)<sup>(10)</sup>. En su forma purificada es el componente principal de todas las vacunas Pa<sup>(12)</sup>. En cuanto a su estructura, está compuesta por seis polipéptidos designados como S1-S5, codificados por los genes *ptxA-ptxE*, respectivamente. El polipéptido S1 constituye la subunidad A de la toxina mientras que la subunidad pentamérica B está compuesta por los péptidos S2, S3, S4 y S5, ensamblados en una proporción 1:1:2:1 en el periplasma bacteriano<sup>(10)</sup>. Su secreción a través de la membrana externa requiere un sistema de transporte de tipo IV codificado por el locus *Ptl*<sup>(13)</sup>. Tras la interacción de la subunidad B con los restos de ácido siálico de glicoproteínas de superficie de la célula huésped<sup>(13)</sup>, la toxina accede al interior vía endocitosis mediada por receptor y, a continuación, se libera la subunidad activa S1 que presenta actividad adenosín-difosfato (ADP) ribosiltransferasa<sup>(12)</sup>. Así pues, esta subunidad cataliza la transferencia de ADP-ribosa desde el NAD<sup>+</sup> a la subunidad  $\alpha$  de distintas proteínas G (G<sub>i</sub>, G<sub>t</sub> y G<sub>o</sub>) provocando su inactivación<sup>(10)</sup> y reduciendo así su capacidad para regular la actividad adenilato ciclasa<sup>(13)</sup>. De esta forma, *B. pertussis* logra inhibir la señalización mediada por ciertas quimioquinas y, consecuentemente, la quimiotaxis en macrófagos, neutrófilos y linfocitos<sup>(12)</sup>.

La TP es responsable de distintos efectos sistémicos asociados a la infección, como linfocitosis, sensibilización a histamina, incremento en la secreción de insulina, hipoglucemia y efectos inmunológicos tanto supresores como estimuladores. Entre otras acciones, se ha demostrado que interfiere en la expresión de moléculas presentadoras de antígenos en el macrófago e incrementa la expresión del receptor del complemento de tipo 3 (CR3) en estas células mimetizando a las selectinas-P y E eucarióticas, y favoreciendo así la adhesión de *B. pertussis*<sup>(10)</sup>. Además, la subunidad B activa distintas moléculas en linfocitos, como la proteína quinasa C y Zap70, que contribuyen a un estado de inmunosupresión<sup>(12)</sup>. A su vez, altera la expresión de moléculas de superficie en células dendríticas, reduciendo la respuesta adaptativa y promoviendo la reinfección, e inhibe la producción de quimioquinas y citoquinas

proinflamatorias, el reclutamiento de neutrófilos a nivel pulmonar, los niveles de Ac séricos y la erradicación bacteriana <sup>(10,12)</sup>.

La toxina adenilato ciclasa (TAC) es una proteína bifuncional con actividad adenilato ciclasa y hemolisina. Al igual que la PT, es una proteína de expresión tardía, por lo que se encuentra presente en la fase virulenta (Bvg<sup>+</sup>). Se trata de una toxina que pertenece a la familia de las citotoxinas formadoras de poros y dependientes de calcio, denominadas toxinas RTX. Es sintetizada como una pro-toxina monomérica a partir del gen *cyaA* y su actividad catalítica adenilato ciclasa se localiza dentro de los 400 aminoácidos del extremo N-terminal, mientras que los 1.300 aminoácidos restantes del extremo C-terminal poseen actividad hemolítica y participan en la liberación del dominio catalítico en el citoplasma de las células eucariotas. El resto de los genes del operón *cyaABCDE* participan en su secreción (a través de un sistema de tipo I) y activación <sup>(10,13)</sup>.

La evasión del sistema inmune por parte de *B. pertussis* comienza a través de la producción de TAC, que se une al CR3 con el fin de penetrar en el interior de los fagocitos y paralizar sus funciones bactericidas, catalizando la síntesis descontrolada de cAMP. El CR3 es una  $\beta$ -2 integrina (CD11b/CD18) que reside en la superficie de neutrófilos, macrófagos y células dendríticas, e interacciona con moléculas localizadas en la superficie bacteriana, favoreciendo su fagocitosis y destrucción. Los ligandos se unen a una región de CR3 denominada dominio-I, capaz de interaccionar con los ligandos una vez que la integrina ha adoptado una conformación activa. Sin embargo, ciertos experimentos revelan que CyaA se une a una forma inactiva de CR3 a través de un sitio de unión externo al dominio-I. Este hecho permite que la toxina se una sin desencadenar una cascada de señalización mediada por la Syk quinasa. Posteriormente, las altas concentraciones de cAMP generadas bloquean eficazmente la activación por iC3b de la ruta de señalización CR3-Syk. Además, CyaA altera la maduración y señalización proinflamatoria de células dendríticas expresoras de CR3, y evade la presentación antigénica y la inducción de una respuesta adaptativa de tipo celular por células dendríticas intraepiteliales de la mucosa respiratoria <sup>(14)</sup>.

Así pues, el incremento de cAMP interfiere en los mecanismos de transmisión de señales en células implicadas en la respuesta innata e inhibe sus funciones antimicrobianas. Además, modula diferentes funciones efectoras, incluyendo la respuesta oxidativa, fagocitosis y quimiotaxis, favoreciendo así la persistencia bacteriana, disminuye la producción de citoquinas proinflamatorias como IL-12p70 y TNF- $\alpha$ , y estimula la secreción

de IL-10, postulándose así como un factor antiinflamatorio y antifagocítico <sup>(12)</sup>. Sin embargo, también promueve respuestas de carácter inflamatorio, y actúa sinérgicamente con el TLR2 y TLR4 para incrementar la expresión de la COX-2. Por otro lado, el dominio hidrofóbico C-terminal forma poros en la membrana de la célula diana causando un eflujo de  $K^+$ , lo cual promueve la formación y activación del inflamasoma NLRP3, resultando en la activación de la caspasa-1 y la liberación de IL-1 $\beta$ . La IL-1 $\beta$  desempeña un papel crucial en la protección del huésped y en la eliminación de la bacteria, al inducir el desarrollo de linfocitos Th17 y el reclutamiento de neutrófilos en el sitio de infección.

Por tanto, al tratarse de uno de los pocos factores de virulencia presentes en todas las especies patógenas del género *Bordetella* <sup>(13)</sup>, la introducción de dicha toxina como componente de las vacunas Pa podría resultar muy útil. En concreto, se ha demostrado en modelo de ratón que induce inmunidad protectora <sup>(12)</sup>.

### 1.6. Calendario de vacunación para la tos ferina

Las vacunas de células enteras (Pw) frente a *B. pertussis*, conformadas por suspensiones de bacterias inactivadas, fueron introducidas en la década de los cincuenta y, consecuencia de su reactogenicidad y variabilidad en cuanto a la calidad, fueron remplazadas en la mayoría de los países desarrollados por vacunas acelulares (Pa). Las vacunas Pa son elaboradas con antígenos purificados, seleccionados por representar factores de virulencia propios de la bacteria y capaces de inducir una respuesta inmune específica. Todas las vacunas Pa actuales contienen al menos formas purificadas de PT, y muchas de ellas incorporan a su vez HFA, PRN y FIM. Las vacunas Pa presentan un mejor perfil de seguridad que las vacunas Pw y han demostrado una buena inmunogenicidad, siendo el nivel de eficacia proporcional al número de tipos de antígenos presentes en la formulación. Sin embargo, puesto que su coste es altamente superior al de la vacunas Pw, las vacunas Pa resultan difíciles de implantar a nivel global <sup>(15)</sup>.

En la actualidad, en España, la pauta de primovacunación para las vacunas frente a difteria-tétanos-tosferina, poliomielitis, *Haemophilus influenzae* tipo b y hepatitis B, se ha simplificado, cambiando de tres a dos las dosis necesarias en los primeros seis meses de vida y administrando, además, una dosis de recuerdo temprana. La simplificación tiene como objetivo reducir el número de pinchazos en el lactante a los estrictamente necesarios, manteniendo y asegurando una adecuada protección. De esta forma, se ha sustituido el

esquema 3+1 por el 2+1, utilizando vacunas que contienen los antígenos DTPa/VPI/Hib/HB a los 2, 4 y 11 meses de edad. Así pues, al suprimir la dosis de los 6 meses, se adopta un esquema de dos dosis de primovacunación más una de recuerdo, que se adelanta desde los 18 a los 11 meses de edad. Se administrará la vacuna DTPa junto con una dosis de VPI a los niños vacunados con pauta 2+1 cuando alcancen la edad de 6 años. A los niños vacunados con pauta 3+1 se les administrará una dosis de dTpa a los 6 años <sup>(16,17)</sup>.

En junio de 2015, la Comisión de Salud Pública aprobó en España la recomendación de vacunar frente a la tos ferina en el tercer trimestre del embarazo, si bien algunas Comunidades Autónomas ya lo habían implantado en sus territorios. La vacuna que se utiliza en embarazadas está combinada y contiene los antígenos del tétanos, difteria de carga reducida y antígenos pertúsicos también de carga reducida, es decir dTpa. Con el objetivo de incrementar el paso transplacentario de anticuerpos, se recomienda administrar una dosis de vacuna dTpa a todas las embarazadas, preferentemente entre las semanas 27-28 y 36 de gestación (idealmente entre las 28 y 32 semanas). En la embarazada, la respuesta inmune se hace patente a los 10-14 días tras la vacunación, produciéndose la máxima transferencia de anticuerpos a partir de la semana 32. Además, los niveles de anticuerpos producidos por la vacunación decrecen rápidamente con el tiempo, por lo que la vacunación antes del embarazo o en sus primeras semanas no proporcionaría un nivel suficiente de anticuerpos protectores al recién nacido. Hay que indicar la revacunación con dTpa en cada gestación, independientemente del tiempo transcurrido entre la última dosis de la vacuna del tétanos-difteria o de dTpa, y de si la mujer ha sido vacunada en un embarazo anterior. Los anticuerpos transferidos al feto a través de la placenta protegen al recién nacido hasta que reciba la primera dosis de vacunación frente a la tos ferina al cumplir los dos meses de edad. Se trata de una forma de inmunización que pretende una doble protección, la del recién nacido y la de la madre <sup>(18)</sup>.

Además de la vacunación en embarazadas, se han propuesto otras estrategias como la vacunación de los profesionales sanitarios que trabajan en áreas de pediatría y obstetricia, y la estrategia del nido, que consiste en vacunar a padres, hermanos, abuelos y cuidadores al menos dos semanas antes del parto, con el fin de reducir las fuentes de infección por *B. pertussis* en la comunidad. En todas las estrategias, excepto en la del recién nacido, la vacuna se realiza con dTpa <sup>(18)</sup>.

## 2. OBJETIVOS

El objetivo principal del trabajo se basa en realizar un estudio acerca de la capacidad de *B. pertussis* para prevalecer en el interior de macrófagos, profundizando en la implicación de dos de los principales factores de virulencia de la bacteria, como son la toxina pertussis (PT) y adenilato ciclasa (TAC), y en la implicación de dicho desarrollo intracelular en la necesidad de elaborar nuevas vacunas. Para ello, se marcó como objetivo el estudio de la respuesta inmune inducida por la infección natural y los distintos tipos de vacunas, como base a la hora de revisar aquellas alternativas que se encuentran en investigación y que pretenden suplir las carencias de las vacunas empleadas en las estrategias actuales.

## 3. METODOLOGÍA

El presente trabajo consiste en una revisión de carácter bibliográfico, en cuya elaboración se ha empleado fundamentalmente la base de datos PubMed, donde se han efectuado búsquedas introduciendo palabras clave como '*Bordetella pertussis*', '*immunity against B. pertussis*', '*whooping cough*', '*intracellular trafficking of B. pertussis*', '*BvgAS system*', '*virulence factors of B. pertussis*', '*acellular pertussis vaccine*' o '*mucosal vaccination against B. pertussis*', y limitándose únicamente a revisiones publicadas entre los años 2000-2017. A su vez, se ha recurrido al empleo de libros especializados en Microbiología Clínica.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Papel de la PT y TAC en el desarrollo intracelular de *Bordetella pertussis*

En los últimos años, se han realizado estudios que han demostrado la capacidad de *B. pertussis* para sobrevivir a nivel intracelular en neutrófilos y macrófagos. Dada la corta vida media de los neutrófilos, los macrófagos se han postulado como un posible nicho intracelular bacteriano. En particular, se ha demostrado que, aunque la mayor parte de las bacterias fagocitadas por macrófagos son rápidamente eliminadas, una fracción relevante de aquéllas no-opsonizadas es capaz de evadir la fusión fagosoma-lisosoma, sobreviviendo durante días y pudiéndose replicar en compartimentos no-ácidos con características de endosomas tempranos. Así pues, estos resultados podrían ayudar a explicar la extraordinaria persistencia de la tos ferina y la habilidad de la bacteria para prevalecer entre poblaciones inmunes <sup>(19)</sup>.

Recientemente, se han llevado a cabo estudios de proteómica que han permitido incrementar el conocimiento acerca del desarrollo intracelular de *B. pertussis*. A pesar de que la proteómica se emplea con frecuencia en el estudio de la expresión de patrones bacterianos, la obtención de muestras de elevada pureza no es fácil cuando se trata del estudio de estadios intracelulares. Gracias al desarrollo de la nano-cromatografía líquida acoplada a espectrómetros de masa en tándem (nanoLC/MS/MS) de alta sensibilidad, el análisis proteico de bacterias de carácter intracelular ha mejorado sustancialmente, permitiendo así identificar bajas cantidades de proteínas bacterianas en muestras de alta complejidad proteica <sup>(20)</sup>.

Los estudios acerca de la evolución del proteoma bacteriano durante esta fase han revelado que *B. pertussis* es capaz de adaptarse al ambiente intracelular, ejerciendo cambios en la expresión de proteínas involucradas en el metabolismo, adquisición de hierro y respuesta frente al estrés. Poco se conoce acerca de la regulación del sistema BvgAS durante la infección intracelular, así como las señales que participan en su modulación. La mayor parte de los factores de virulencia cruciales presentes en la fase Bvg<sup>+</sup> (PT, TAC, HFA, entre otros) han sido identificados a las 3 y 48h de la infección, lo cual sugiere que dichos factores podrían requerirse durante la fase intracelular. Estos resultados concuerdan con estudios previos que señalan tanto a la PT como a la TAC como principales factores de virulencia implicados en la evasión del sistema inmune y desarrollo intracelular de *B. pertussis* <sup>(20)</sup>.

Los mecanismos desarrollados por los patógenos intracelulares se basan en ejercer cambios a nivel transcripcional en las células infectadas, dificultando así la eliminación del patógeno. Durante los últimos años, se han realizado estudios mediante qRT-PCR acerca de la respuesta transcripcional de aquellos genes implicados en mecanismos bactericidas y respuesta inflamatoria. En dichos estudios llevados a cabo con células THP-1, se ha observado que *B. pertussis* es capaz de reducir parcialmente la respuesta bactericida posterior a su fagocitosis, dado que parte de los genes involucrados en la misma no se encuentran expresados a este nivel. En particular, la expresión de *ACP2* y *ACP6*, que codifican fosfatasa ácidas con actividad bactericida, se encuentra inhibida tras la fagocitosis y permanece en este estado hasta dos días después. Sin embargo, genes como *CAT* (catalasa), *CTSB* (catepsina B), *CTSD* (catepsina D), *CTSG* (catepsina G) y *CTSS* (catepsina S), codificantes de proteínas implicadas en la respuesta celular antimicrobiana, se expresan en una primera instancia mientras que conforme la infección progresa su expresión queda reducida <sup>(21)</sup>.

A su vez, *B. pertussis* parece haber desarrollado estrategias para evitar la activación de las células T ya que, además de reducir la expresión de la proteasa lisosomal cathepsina B y el cofactor de presentación antigénica HLA-DM, tras 48h de la fagocitosis se ha observado la inhibición de otros genes implicados en la presentación antigénica, tales como *CTSS*, *CTSB* y *CTSD*. Todos estos resultados, junto con la reducción de la expresión de citoquinas proinflamatorias, como la IL-8 y TNF- $\alpha$ , durante el periodo de infección y la alta expresión de citoquinas antiinflamatorias, como la IL-10, indican que aquellas bacterias que han prevalecido intracelularmente en los fagosomas han modificado la respuesta de los macrófagos con el fin de alcanzar un ambiente permisivo en el cual persistir <sup>(21)</sup>.

Como se indicó con anterioridad, *B. pertussis* presenta dos potentes toxinas, la PT y TAC, cuya implicación en la modulación de la respuesta inmune e inflamatoria por parte del huésped ha sido recientemente descrita. La PT se ha definido como la principal toxina implicada en la regulación de la expresión de la mayor parte de los genes involucrados en la actividad microbicida y cuya expresión se ve reducida en células infectadas. Además, la inhibición complementaria de otros genes requiere la expresión adicional de TAC. De esta forma, en las células infectadas con cepas de *B. pertussis* deficientes en la producción de PT (BpPT<sup>-</sup>) se observa un incremento en la transcripción de *ACP2*, *ACP6*, *GNLY* (granulosina), *LYZ* (lisozima), *DBF1* ( $\beta$ 1-defensina) y *CTSG* a las 48h de la infección en comparación con las células infectadas por la cepa wild-type. La modulación negativa de *CTSB*, *CTSD* y *CTSS* requiere la expresión tanto de PT como de TAC. A su vez, la reducción en la expresión de citoquinas inflamatorias tiene lugar 48h tras la infección y depende de ambas toxinas en el caso de *IL-8*, pero principalmente de TAC en el caso de *TNF- $\alpha$* , encontrándose la PT únicamente implicada en un corto periodo tras la infección <sup>(21)</sup>.

El complejo control de la respuesta inflamatoria en macrófagos depende de proteínas supresoras de la señalización por citoquinas (SOCSs). La TAC parece encontrarse implicada en la sobreexpresión de *IL-10* a las 3h de la infección, puesto que en la infección por cepas deficientes en la producción de TAC (BpTAC<sup>-</sup>) la expresión de *IL-10* se ve fuertemente reducida. Lo mismo ocurre en el caso de *SOCS3*, de forma que se ha establecido que la sobreexpresión temprana de *IL-10* y *SOCS3* en células infectadas previene la eliminación de la bacteria por parte de los macrófagos. La expresión de *SOCS1* no se ve modificada hasta 48h tras la infección, punto en el cual la expresión de *SOCS3* se reduce. Este hecho es particularmente significativo, ya que un ratio *SOCS1/SOCS3* elevado es característico de macrófagos M2.

Los macrófagos con fenotipo M1 desarrollan una fuerte capacidad bactericida, fundamentalmente frente a patógenos intracelulares, mientras que los M2 promueven su crecimiento. Así pues, se cree que tal como ocurre con otros patógenos intracelulares, *B. pertussis* tendría la capacidad de polarizar los macrófagos hacia un fenotipo M2 <sup>(21)</sup>.

#### 4.2. Respuesta inmune y desarrollo de nuevas vacunas

Dada la evidencia del desarrollo intracelular de *B. pertussis*, en los últimos años la respuesta inmune celular se ha postulado como el componente indispensable para la completa erradicación de la infección primaria causada por *B. pertussis*. El estudio de la respuesta de células T en infantes inmunizados con vacunas celulares y acelulares sugiere que inducen distintas subpoblaciones de células T CD4<sup>+</sup>.

Estudios recientes realizados en ratones señalan que la protección conferida por las vacunas celulares involucra la activación de TLR4 y la producción de IL-1, IL-12 e IL-23 por células dendríticas, lo que conduce a la estimulación de una respuesta de perfil tipo Th1/Th17. Por el contrario, la inmunización con vacunas acelulares induce la producción de IL-5 y anticuerpos IgG1, lo que determina un perfil tipo Th2. Las células Th1 resultan esenciales en la inmunidad celular y expresan INF- $\gamma$  e IL-12, mientras que las Th2 juegan un papel más importante en el desarrollo de la respuesta humoral y se caracterizan por la secreción de altos nivel de IL-4, IL-5 e IL-13. Recientemente, se han descrito las células Th17, que expresan las citoquinas IL-17, IL-21 e IL-22, y se encuentran implicadas en la respuesta inflamatoria del huésped contra distintos patógenos <sup>(10,22)</sup>.

En relación a la inmunidad humoral, se ha demostrado que los anticuerpos contra determinados antígenos de *B. pertussis* cumplen un rol fundamental en la protección frente a la infección, ya que pueden prevenir la adhesión a las células epiteliales del tracto respiratorio a través del bloqueo de adhesinas, neutralizar toxinas bacterianas o promover la fagocitosis facilitada por opsoninas <sup>(10)</sup>.



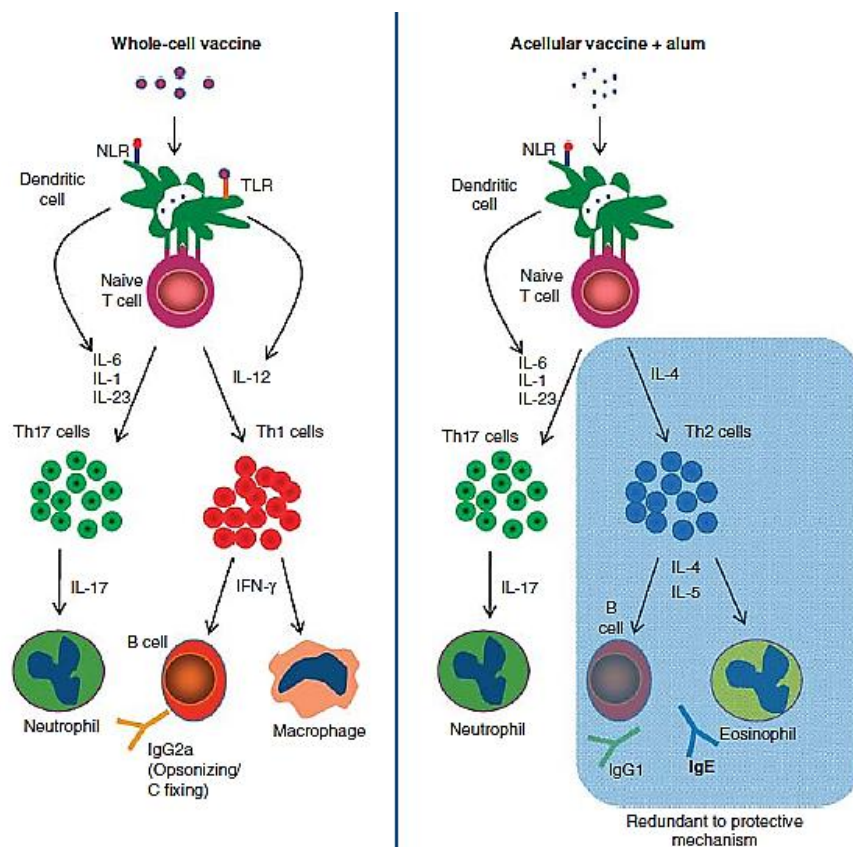


Figura 2. Distintos mecanismos de inmunidad inducida por las vacunas de células enteras y acelulares<sup>12</sup>

La necesidad de estimular la respuesta celular en la protección frente a *B. pertussis* explicaría la menor protección conferida por las vacunas acelulares, inductoras de respuesta principalmente humoral. Es por ello por lo que en la actualidad, el desarrollo de nuevas vacunas frente a *B. pertussis* ha adquirido especial relevancia. Así pues, se han considerado distintas estrategias, entre las que destacan la elaboración de vacunas compuestas únicamente por componentes de vacunas Pa, la modificación o incorporación de nuevos Ag, o la modificación del adyuvante de las vacunas Pa actuales y la producción de vacunas de diferente forma de administración<sup>(23)</sup>.

La inmunidad inducida por las vacunas Pa decae alrededor de los diez años, de forma que en la adolescencia la protección se encuentra muy reducida. A esto se suma que la infección en adolescentes y adultos es de carácter asintomático, por lo que dichas poblaciones al no estar protegidas podrían suponer un reservorio que favoreciese la transmisión bacteriana a neonatos y niños. Todo ello permite destacar la importancia de una amplia cobertura de vacunación en la población diana, la necesidad de vacunas que confieran protección a largo plazo y el desarrollo de vacunas apropiadas para neonatos<sup>(24)</sup>.

Dichos requerimientos han llevado al desarrollo de la vacuna atenuada de administración intranasal BPZE1, que conserva la capacidad de colonizar el tracto respiratorio pero carece de patogenicidad, dada la atenuación de varios factores de virulencia presentes en la bacteria. Las vacunas mucosales presentan amplias ventajas comparadas con las de administración parenteral, puesto que la ruta proporcionada mimetiza la infección natural por *B. pertussis* y la protección proporcionada se produce a través de la mucosa y por vía sistémica, no requiere un proceso invasivo de administración, evita el uso de jeringuillas con la consecuente posible transmisión de enfermedades infecciosas y la formación de personal sanitario para su administración. En la actualidad, junto con las vacunas de administración oral, las vacunas mucosales son objeto de estudio. Sin embargo, la rápida degradación enzimática, así como la exposición a niveles bajos de pH en el tracto gastrointestinal y la reducida absorción han supuesto importantes obstáculos para el desarrollo de vacunas de administración oral, que habitualmente resultan en una baja inmunogenicidad y requieren la administración de altas cantidad de Ag combinado con un potente adyuvante <sup>(25)</sup>.

Para la elaboración de la vacuna BPZE1, la PT ha sido genéticamente atenuada (iPT) con el fin de suprimir su actividad enzimática y mantener su alto poder inmunogénico. Esta modificación se consigue sustituyendo en la subunidad 1 la Arg9 por una Lys y la Glu129 por una Gly. En la vacuna BPZE1, el gen que codifica la toxina dermonecrótica es deletado, mientras que la citotoxina traqueal es atenuada por la sobreexpresión transgénica del transportador proteico AmpG de *Escherichia coli*. La vacuna ha demostrado conferir inmunidad a más largo plazo, y ser eficaz, segura y genéticamente estable tanto *in vitro* como *in vivo* en modelos animales neonatos y adultos, incluyendo ratones inmunocomprometidos. La vacuna BPZE1 induce un perfil de respuesta inmune de tipo Th1/Th17, lo cual adquiere mayor importancia en caso de neonatos puesto que a este nivel las respuestas Th1 son escasas por la falta de maduración del sistema inmune. BPZE1 induce una respuesta longeva de células B de memoria, así como títulos elevados y duraderos de Ac detectables en suero frente a *B. pertussis* <sup>(24)</sup>. Además, su uso como vector de antígenos heterólogos para el desarrollo de vacunas que protejan simultáneamente frente a varias infecciones mediante única administración se encuentra actualmente en estudio. Como consecuencia de sus llamativas características, se encuentra en la actualidad sometida a ensayos clínicos de fase 1b en humanos <sup>(25)</sup>.

Otras vacunas mucosales se encuentran en estudio en modelos animales, como la vacuna acelular basada en vesículas de membrana externa de *B. pertussis* (OMVsBpPagL). Así pues, se ha descrito que la Tdap<sub>OMVsBpPagL</sub> induce respuesta duradera mediada por IgG específicas frente a *B. pertussis*. En concreto, la respuesta inducida es predominantemente de tipo IgG2a, lo cual conlleva la estimulación de una respuesta de tipo Th1. Todo ello contrasta con la vacuna Tdpa que, administrada junto con aluminio como adyuvante, produce una respuesta de tipo Th2 y muy débilmente de tipo Th1 (elevado ratio IgG1/IgG2 y bajos niveles de INF- $\gamma$ ). Así pues, esta evidencia abre la posibilidad de un empleo futuro de vacunas OMVs como estrategia de inmunización inicial, seguida de recuerdos u otras formulaciones de carácter acelular <sup>(26)</sup>.

Finalmente, dentro de los adyuvantes que se encuentran en investigación por su capacidad para potenciar la respuesta Th1 se encuentran los oligonucleótidos con motivos inmunoestimuladores CpG (CpG ODN) <sup>(27)</sup> y los agonistas del receptor TLR2 <sup>(28)</sup>.

## 5. CONCLUSIONES

En países desarrollados, a pesar de la amplia cobertura de vacunación, la tos ferina se trata de la única enfermedad infecciosa prevenible mediante vacunación que no se encuentra bajo control. Tras años de intensa investigación, múltiples aspectos de la fisiología y patogénesis de *Bordetella pertussis* continúan sin entenderse al completo. Los estudios de proteómica y expresión transcripcional de genes han aportado información acerca del estadio intracelular de la bacteria, así como de la relevancia en el proceso de dos de sus principales toxinas, la toxina pertussis (PT) y adenilato ciclasa (TAC). Dicho desarrollo intracelular permitiría explicar el porqué del fracaso de las actuales estrategias de vacunación basadas en vacunas de carácter acelular. Así pues, es preciso que continúen las investigaciones para la elaboración de nuevas vacunas que estimulen un perfil de respuesta inmune de tipo Th1/Th17, confieran inmunidad a más largo plazo y se adapten a la fisiología del neonato, como es el caso de la vacuna en estudio clínico BPZE1. Por tanto, en vistas al desarrollo de nuevas vacunas, la implantación de estrategias de vacunación de mayor eficacia, como la vacunación en mujeres gestantes, podrían ser claves en la contención de la reemergencia de la enfermedad.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Mirón Hernández A, et al. *Bordetella pertussis*. DataBio: fichas de agentes biológicos (Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo), 2015; 1-4.
- (2) Ulloa MT. *Bordetella pertussis*. Retrato microbiológico. Rev Chil Infect 2008; 25 (2): 115.
- (3) Romero Cabello R. *Microbiología y Parasitología Humana*. Ed. Médica Panamericana. 2007; 3ª edición: cap. 81: 903.
- (4) *Situación de la Tos ferina en España, 2005-2016*. Centro Nacional de Epidemiología – ISCIII (Ministerio de Economía, Industria y Competitividad).
- (5) Porras-Povedano M, Roldán-Garrido A, Santacruz-Hamer V. *Brote epidémico por Tos ferina en Écija*. Rev Esp Salud Pública 2007; 91: e1-e10.
- (6) Arbolave DLVE. *Actualización en tos ferina*. Pediatr Integral 2014; 17 (2): 101-107.
- (7) Osses R, Díaz O, Saldías F. *Infección por Bordetella pertussis: Una causa emergente de tos prolongada en adolescentes y adultos*. Rev Chil Enferm Respir 2010; 26: 30-36.
- (8) Quirós González G, Solano Tenorio N. *La Tosferina: Un acercamiento a sus últimas investigaciones*. Med leg Costa Rica [online]. 2016; 33: 262-268.
- (9) Decker KB, et al. *The Bordetella Pertussis Model of Exquisite Gene Control by the Global Transcription Factor BvgA*. Microbiology 2012; 158: 1665–1676.
- (10) Álvarez Hayes J. *Biología y vacunas. Proteómica aplicada a la identificación de factores de virulencia e inmunógenos presentes en el fenotipo infectante de Bordetella pertussis*. Tesis Doctoral, 2013. Facultad de Ciencias Exactas, Departamento de Química (Universidad Nacional de la Plata).
- (11) Beier D, Gross R. *Regulation of bacterial virulence by two-component systems*. Current opinion in Microbiology 2006; 9: 143-152.
- (12) Higgs R, et al. *Immunity to the respiratory pathogen Bordetella pertussis*. Mucosal Immunology 2012; 5: 485–500.
- (13) Melvin JA, et al. *Bordetella pertussis pathogenesis: current and future challenges*. Nat Rev Microbiol 2014; 12(4):274-88.
- (14) Radim O, et al. *Bordetella Adenylate Cyclase Toxin Is a Unique Ligand of the Integrin Complement Receptor 3*. eLife 2015; 4: e10766.
- (15) Cofré J. *Vacunas anti-pertussis: acelular versus celular. ¿Acaso un regreso al pasado?* Revista chilena de infectología 2015; 32(5), 559-563.
- (16) *Cambio del calendario común de vacunación infantil: razones para la implantación de un esquema 2+1*. Información para profesionales sanitarios. Ponencia de Programas y Registro de Vacunaciones 2016. Comisión de Salud Pública del Consejo Interterritorial del Sistema Nacional de Salud - Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad.
- (17) *Revisión del Calendario de Vacunación*. Ponencia de Programas y Registro de Vacunaciones 2016. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad.
- (18) *Preguntas y respuestas sobre vacunación frente a la tos ferina en embarazadas para profesionales sanitarios. Información para profesionales sanitarios*. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad.
- (19) Lamberti AY, et al. *Intracellular Trafficking of Bordetella pertussis in Human Macrophages*. Infect Immun 2010; 78(3): 907–913.
- (20) Lamberti Y, et al. *Proteome analysis of Bordetella pertussis isolated from human macrophages*. J Proteomics 2016; 136: 55-67.
- (21) Valdez HA, et al. *Bordetella pertussis modulates human macrophage defense gene expression*. Pathog Dis 2016; 74(6).
- (22) Fedele G, Cassone A, Ausiello MC. *T-cell immune responses to Bordetella pertussis infection and vaccination*. FEMS Pathogens and Disease 2015; 73(7).
- (23) Meade BD, Plotkin SA, Locht C. *Possible Options for New Pertussis Vaccines*. 2014. J Infect: 209: S24-S27.
- (24) Skerry Ciaran M, Bernard P. Mahon. *A Live, Attenuated Bordetella Pertussis Vaccine Provides Long-Term Protection against Virulent Challenge in a Murine Model*. Clinical and Vaccine Immunology 2011; 187–193.
- (25) Li R, Lim A, Alonso S. *Attenuated Bordetella Pertussis BPZE1 as a live vehicle for heterologous vaccine antigens delivery through the nasal route*. Bioeng Bugs 2011; 2(6): 315-9.
- (26) Gaillard, ME, et al. *Acellular pertussis vaccine based on outer membrane vesicles capable of conferring both long-lasting immunity and protection against different strain genotypes*. Vaccine 2014; 32 (8): 931-7.
- (27) Catpagavalli A, Corbel M, Xing D. *A CpG-Containing Oligodeoxynucleotide Adjuvant for Acellular Pertussis Vaccine Improves the Protective Response against Bordetella Pertussis*. Human Vaccines & Immunotherapeutics 2013; 325–331.
- (28) Dunne A, et al. *A novel TLR2 agonist from Bordetella pertussis is a potent adjuvant that promotes protective immunity with an acellular pertussis vaccine*. Mucosal Immunol 2015; 8(3): 607-17.